

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑬ 日本国特許庁(J P)

⑭ 特許出願公開

⑮ 公開特許公報(A)

昭64-86974

⑯ Int. Cl.<sup>4</sup>

A 61 L 27/00  
A 61 K 37/02

識別記号

ADT

庁内整理番号

G-6779-4C  
8615-4C

⑰ 公開 昭和64年(1989)3月31日

審査請求 有 請求項の数 6 (全6頁)

⑱ 発明の名称 半月組織の治療用薬剤配合物及びインプラント

⑲ 特 願 昭63-150381

⑳ 出 願 昭63(1988)6月20日

優先権主張 ㉑ 1987年6月19日 ㉒ 米国(U S) ㉓ 064215

㉔ 1988年6月8日 ㉕ 米国(U S) ㉖ 204097

㉗ 発 明 者 パート・エル・バリー 米国マサチューセッツ州ケンブリッジ、ブラウン・ストリート56

㉘ 発 明 者 トマス・グイー・キング 米国マサチューセッツ州ウインチエスター、トワー・ボカホンタス・ドライブ(番地なし)

㉙ 出 願 人 プレジデント・アンド・フェローズ・オブ・ハーバード・コレッジ 米国02138マサチューセッツ州ケンブリッジ、クインシー・ストリート17

㉚ 代 理 人 弁理士 倉内 基弘 外1名

明 細 書

1 発明の名称 半月組織の治療用薬剤配合物及びインプラント

2 特許請求の範囲

(1) 破損軟骨治療のための脈管形成因子を含有する薬剤配合物。

(2) 前記脈管形成因子が下式で表わされるポリペプチド:

<Glu-Asp-Asn-Ser-Arg-Tyr-Thr-His-  
Phe-Leu-Thr-Gln-His-Tyr-Asp-Ala-Lys-  
-Pro-Gln-Gly-Arg-Asp-Asp-Arg-Tyr-  
Cys-Glu-Ser-Ile-Met-Arg-Arg-Arg-Gly-  
-Leu-Thr-Ser-Pro-Cys-Lys-Asp-Ile-  
Asn-Thr-Phe-Ile-His-Gly-Asn-Lys-Arg-  
-Ser-Ile-Lys-Ala-Ile-Cys-Glu-Asn-  
Lys-Asn-Gly-Asn-Pro-His-Arg-Glu-Asn-  
-Leu-Arg-Ile-Ser-Lys-Ser-Ser-Phe-  
Gln-Val-Thr-Thr-Cys-Lys-Leu-His-Gly

<sup>70</sup>  
-Gly-Ser-Pro-Trp-Pro-Pro-Cys-Gln-  
Tyr-Arg-Ala-Thr-Ala-Gly-Phe-Arg-Asn  
<sup>105</sup>  
-Val-Val-Val-Ala-Cys-Glu-Asn-Gly-  
<sup>120</sup>  
Leu-Pro-Val-His-Leu-Asp-Gln-Ser-Ile  
<sup>125</sup>  
-Phe-Arg-Arg-Pro-OH

或は該ポリペプチドと実質的に同じ脈管形成能を有する該ポリペプチドの軟骨形成部片または誘導体である前記第1項記載の配合物。

(3) 前記脈管形成因子を生理学的に許容し得る該因子用キャリアーに植え付けた形である前記第1項または第2項記載の配合物。

(4) 脈管形成因子を固体ポリマーとアルブミンとのブレンドである固体キャリアー中に含む創傷後の半月の通常無血管組織の治療を促進するインプラント。

(5) 前記脈管形成因子が下式のポリペプチド:  
<Glu-Asp-Asn-Ser-Arg-Tyr-Thr-His-Phe-  
-Leu-Thr-Gln-His-Tyr-Asp-Ala-Lys-  
Pro-Gln-Gly-Arg-Asp-Asp-Arg-Tyr-Cys-  
Glu-Ser-Ile-Met-Arg-Arg-Arg-Gly-

Leu-Thr-Ser-Pro-Cys-Lys-Asp-Ile-Asn<sup>45</sup>  
 -Thr-Phe-Ile-His-Gly-Asn-Lys-Arg-<sup>60</sup>  
 Ser-Ile-Lys-Ala-Ile-Cys-Glu-Asn-Lys<sup>75</sup>  
 -Asn-Gly-Asn-Pro-His-Arg-Glu-Asn-<sup>90</sup>  
 Leu-Arg-Ile-Ser-Lys-Ser-Ser-Phe-Gln<sup>105</sup>  
 -Val-Thr-Thr-Cys-Lys-Leu-His-Gly-<sup>120</sup>  
 Gly-Ser-Pro-Trp-~~Trp~~-Pro-Pro-Cys-Gln<sup>135</sup>  
 -Tyr-Arg-Ala-Thr-Ala-Gly-Phe-Arg-<sup>150</sup>  
 Asn-Val-Val-Val-Ala-Ala-Cys-Glu-Asn-Gly<sup>165</sup>  
 -Leu-Pro-Val-His-Leu-Asp-Glu-Ser-<sup>180</sup>  
 Ile-Phe-Arg-Arg-Pro-OR<sup>195</sup>

である特許請求の範囲第4項記載のインプラント。

(6) 前記ポリマーがエチレン-ビニルアセテートポリマーである特許請求の範囲第5項記載のインプラント。

### 3 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は損傷を与えられた通常無血管の組織の治療を促進する薬剤配合物及びインプラントに関

し、より詳細には尿管形成因子を損傷の近くに適用して治癒を促進するための薬剤配合物及びインプラントに関する。

#### 従来の技術

通常無血管の組織、特にヒズ或は手根、肋骨の末梢、或は関節下顎関節の半月（メニスカス）等の軟組織が、裂傷或は断傷等の損傷の後には或は故意の外科切開の後には、血管新生された周辺を除いて、耐血管化及び治癒性であることは昔から知られている。キング、J. Bone Joint Surg., 18巻、333-342頁（1936年）は、裂傷させた犬の半月を、裂傷が関節と側面を通じるとすれば、組合組織によつて治癒されることを教示した。この教示内容はカバード（Cabard）等、Am. J. Sports Med., 9(3)巻、129-134頁（1981年）によつて隠蔽された。後者は、犬及びモンキーの裂けた半月の治療が周辺滑膜組織と接触する尿管形成組織を通して行なわれ及び裂傷の深部に伸びることを示した。ヒートリー（Heatley）、J. Bone Joint Surg.,

62-B巻、397-402頁（1980年）は、切開したウサギの半月を切開を縫合して治癒することを立証し及び血管組織でなく、滑液細胞の侵入が治癒の前駆として始まり、大して血管のない組織となることを示した。アーノフスキー（Arnosky）等、Am. J. Sports Med., 10(2)巻、90-95頁（1982年）は、血管がヒトのヒズの半月の周辺四分の一においてのみ見出されることを示し及び尿管供給があまりに乏しくて組織軟骨を裂傷した後の自発的治癒を促進する炎症性応答を支持することができないと結論した。

尿管形成因子は創傷治癒において重要な役割を果たすことが知られており（レッテラ（Rettura）等、FASEBアブストラクト第4509号、61回アンニアルミーティング、シカゴ、（1977年））及び腫瘍細胞及び創傷液から（バンダ（Banda）等、Proc. Natl. Acad. Sci., アメリカ合衆国、79巻、7773-7777頁（1982年）、米田特許4503058号）及び網膜細胞から（ドアモール（D'Amore）、Proc. Natl. Acad.

Sci., アメリカ合衆国、78巻、3068-3072頁（1981年））誘導された。フォークマン（Folkman）等、J. Exp. Med., 153巻、275-288頁（1971）はウォーカー（Walker）256ラット腹水腫瘍から腫瘍尿管形成因子を単離した。因子は毛管内皮細胞についてミトゲンであり及びR Naseによつて不活化された。ツアン（Tsau）等、バイオケミストリー、12巻、3159-3165頁（1973年）は、ウォーカー256腫瘍の非ヒストンタンパクにおいてミトゲン及び尿管形成活性を見出した。活性成分はタンパク質と炭水化物との混合物であつた。種々の動物及びヒトの腫瘍が尿管形成因子を産生することが示された（フィリップス及びクマー（Kumar）、Int. J. Cancer, 23巻、82-88頁（1979年））が、因子の化学的性質は求められなかつた。ウォーカー256腫瘍からの低分子重非タンパク質成分もまた尿管形成性であり及びミトゲン性であることが示された（ワイズ（Weiss）等、Br. J. Cancer, 40巻、493-496頁

(1979年))、フェンセロー(Fenselau)等、*J. Biol. Chem.*, 256巻、9605-9611頁(1981年)は分子量400-800ダルトンを有する尿管形成因子を精製して均質にしたが、それ以上特性表示しなかつた。ヒトの肺腫瘍細胞は、高分子量キャリアー及び低分子量の、おそらく非タンパク質、活性成分から成る尿管形成因子を分泌することが示された(クマー等、*Int. J. Cancer*, 52巻、461-464頁(1983年))。バリー(Vallee)等、*Experientia*, 41巻、1-15頁(1985年)は、ウオーカー256腫瘍からの3つの留分に伴う尿管形成因子を見出した。トルバート(Tolbert)等、米国特許4,229,531号は、ヒト腺癌細胞系HT-29から尿管形成因子を生成することを開示した。ヘパリン-ビルディンググロースファクター、トランスホーミンググロースファクターアルファ、トランスホーミンググロースファクターベータもまた知られている尿管形成因子である。アンギオゲニンとして知られている尿管形成タンパク質がヒト癌細胞から単

及びその尿管形成性断片或は部分或は1~数個のアミノ酸を削除或は置換させ、上に挙げた式のペプチドと実質的に同じ尿管形成活性を維持するそのペプチド誘導体が本発明を実施するために選んでいる。記号>Gluはピログルタミン酸部分を表わすのに用いる。

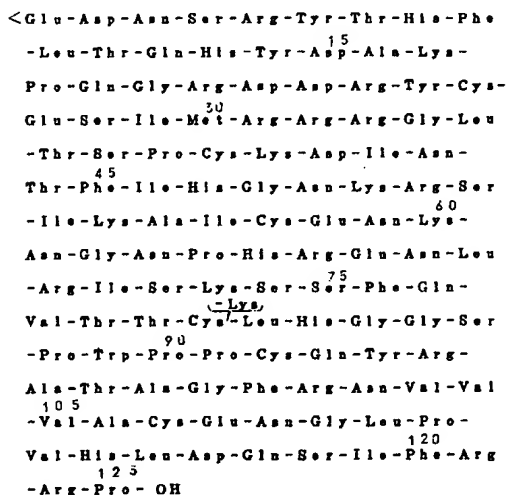
遺伝子工学分野における当業者ならば、遺伝子工学技法によつて簡便に作ることができる上記のペプチド構造に関連した種々のペプチドを認めるものと思う。それらのペプチドは、リーダーセグメント、例えば満足される(met)開始コドンによつてコードされたセグメント等、を有することができる。こうして、上記の構造に均等な広範囲のペプチドが、慣用の遺伝子工学技法によつて容易に入手し得る。

#### 問題点を解決するための手段

今、有効投与量の尿管形成因子を損傷された組織の近辺に与えることを含む、裂傷、断傷或は切除等の損傷或は断裂した後の半月の通常無血管の組織の治療を促進する薬剤配合物を見出した。最

良の結果を得るためには、尿管形成因子を、例えば、尿管形成因子及び製薬上容認され得る非毒性キャリアーを含む組成物の形で、損傷部位の近くに或は直ぐ隣りに、好ましくは損傷された組織に直接接触させて適用或は移植する。キャリアーは液体であつても或は固体であつてもよく、及び例えばポリマー、例えばメチルセルロース或はエチレンとビニルアセテートとのコポリマー、或は尿管形成因子を長い時間にわたつてゆっくり放出する他のポリマー組成物にすることができる。後者の場合、尿管形成因子は時間放出インプラントの形である。本発明は上述した半月のような静脈管に特別の応用を有する。

すなわち、下記式のペプチド：



良の結果を得るためには、尿管形成因子を、例えば、尿管形成因子及び製薬上容認され得る非毒性キャリアーを含む組成物の形で、損傷部位の近くに或は直ぐ隣りに、好ましくは損傷された組織に直接接触させて適用或は移植する。キャリアーは液体であつても或は固体であつてもよく、及び例えばポリマー、例えばメチルセルロース或はエチレンとビニルアセテートとのコポリマー、或は尿管形成因子を長い時間にわたつてゆっくり放出する他のポリマー組成物にすることができる。後者の場合、尿管形成因子は時間放出インプラントの形である。本発明は上述した半月のような静脈管に特別の応用を有する。

有効な用途について要求される投与量は使用する尿管形成因子の強さ及び純度に応じて広範囲にわたつて変わる。純アンギオゲニン(angiotensin)の場合、メチルセルロースのような急速に放出させるようなキャリアーで投与する場合、投与量は治療すべき傷の長さ2~4mm当り500~900ngの範囲になり得る。特定の場合における有効

な投与量の最適なサイズは日常の試験によつて決めることができる。本薬剤配合物は治療を通常6~10週内で完治するので、およそ同じ期間、すなわち、6~10週間伸ばして脈管形成因子の供給を与える時解放出インプラントを用いるのがよい。

半月の無血管中央部分における損傷に關接して移植或は投与する際の脈管形成因子は新脈管形成(neovascularization)、次いで損傷を、癒合を使用しないでさえ、治療することを含む。

右側下方肢全体の毛をそり、70%のアルコール溶液で剃え及び消毒したタオルで包んだ。ひざ関節を、外側パラパテラスキャン及び支持切開して暴露した。小板の中央を脱臼させ、脾骨髄のオリジンで分割し、ひざを曲げた。10×6mmを用いた双眼解剖用顕微鏡下で、ミクロスキャンフックを半月の前のホーンに入れた。半月を前方に引き及び外側半月の前方三分の一を目視した。小さいメスを用いて半月縁から2mmで出発して半月の本体にかよそ0.8mm×2.5mmの水平ポケットを刻いた。ポケットを後に半月体の中央三分の一の頂底組織の可視表面で伸ばした。滑膜への損傷を最小にするように注意を払った。

メチルセルロース(40000CP)をオートクレーブに入れ、次いで滅菌水中4℃で一晩攪拌して溶解した(1.5mg/ml)。アンギオゲニンの凍結乾燥した塩の存在しない原料を1%のメチルセルロース中4℃で2時間温やかに攪拌して懸濁させた。10ミクロリットル容量を清浄な、乾燥した

マイラーシートの上にのせ、腐敗条件下で乾燥

下配の特定期例は、発明を例示するつもりであつて、発明の範囲を制限するつもりのもではない。

個々のケージに入れた各々が重さ5~7kgの97匹の雄のニュージーランド白色ウサギに標準の食餌を与えたが、手術の前後の両方で、テトラサイクリンを予防として飲み水に加えた。

アセプロマジン(Acepromazine)マレエート(カンザス、エルウッド、Tech America Group, Inc.: 2-アセチル-10-(5-ジメチルアミノ-プロピル)フェノチアジンヒドロジエンマレエート)、15mg/体重1kg及びビタミン(ニューヨーク、シラキユース、Bristol Laboratories: DL-2-(6-クロロフェニル)-2-(メチルアミノ)シクロヘキサノンヒドロクロリド)、25mg/体重1kgの筋肉内注射及び1%のキシロカイン(マサチューセツツ、ウエストボロー、Astra Pharmaceutical Products, Inc.: アセトアミド、2-(ジエチルアミノ)-N-(2,6-ジメチルフェニル)-モノヒドロクロリド)2ccの局所皮下注射を用いて、ウサギに麻酔した。

したマイラーシートの上にのせ、腐敗条件下で乾燥して直径3mmの透明なペレット或はディスクを形成した。各々はアンギオゲニン100ngを収容した。ペレットを収容するシートを滅菌した正方形ペレット皿に入れ、デシケーター中に入れ、更に60分間凍結乾燥して、ペレットが完全に乾燥するのを確認した。アンギオゲニンを含有しない対照のメチルセルロースディスクを調製した。ディスクを、滅菌条件下で、個々に針子でプラスチックシートから取り出し、折りたたみ、各々を別々に20ゲージ針の鋭い端部に差し込んだ。

試料を保持する20ゲージの針の尖端を各ラビットの半月のポケットに挿入し、20ゲージのとげ状(spinal)針からの栓を用いて針から円板を外し、試料を正確に取り出し及び半月組織中へ押し込んだ。次いで、1mmの垂直切断(ナイフカット)をポケットの中間に作つて縦の裂傷をシミュレートした。

（試料を伸ばし）  
探索骨を収容し、組織を500mgゲンタミシン/1gを含有する0.9%食塩水で洗浄した。該探索

帯を5-0ビクリル(Vicryl) 吸収性縫合を間欠的に8箇所行つて閉じ、4-0ビクリル皮下連続縫合で皮ふを閉鎖した。ラビットをケージ内に置き、標準の餌を与えた。ナトラサイクリンを術後、術後に飲料水に加えた。

ラビットの群を、アセプロマジンマレエート30mg/kg及びケタミン50mg/kgの致死の静脈注射を用いて、3、6、8、9、12及び26週の間隔で殺した。腫瘍節を解剖顕微鏡を用いて全体的に検査し、所見を記録した。観察群には移植した資料の識別をブラインドにした。結果を新脈管形成の有無により評価した。それらの試料については、ポケット及び切断の有無(治療・非治療)に関して第2の観察を記録した。

組織学的検査についての試料を10%中性緩衝ホルマリン溶液中に貯蔵した。半月とその下の骨を通る横断切片を脱灰し、ヘマトキシリン及びエオシンで包埋し及び染色させ、光学顕微鏡検査した。

アンギオゲニンを移植した75個の半月のうち、

前角の上に成長し、それがポケット及び切断部へ向つていた。隆起血管は見られず、連絡組織はポケットまたは切断部に達していなかった。しかし、これらの結果は有効例として評価される。

アンギオゲニン群と対照群との統計上の差は有意であつた。

アンギオゲニン群では、新脈管形成は4週間前に殺したもののうち27% (8個中3個)に見られ、6~10週のものでは57% (53個中30個)に見られ、また10週後のものは43% (14個中6個)に見られた。治療時間の分析を表1に示す。

対照群において、2つの「ポジティブな」応答が6週及び8週に見られた。

39 (52%)に新脈管形成が観察された。新脈管形成は前角及び半月の本体に接する前膜から移植ポケット方向に成長する、隆起血管との結合組織のパンヌス(血管増殖)と特徴付けられる。ポケット口と切断部の閉鎖(「治療」)はこれら39個の新脈管形成半月中、6個(21%)で起きた。「治療」はポケットを縫い、且つ口を強く充分な知覚の結合組織のパンヌス形成に付着するものと思われる。半月の前角の狭窄は、「治療組織」のある程度の治療組織が起きていたかの如くこの強い反応に伴うことがしばしばあつた。

新脈管形成のないアンギオゲニン群は、明らかに術後変化がなく、移植日と同じに見え、血管形成はパンヌスが見られなかった。ポケットと切断部は変わらず、メチルセルロースは見出されなかった。

対照群では、22個中20 (91%)の個は手術日の状態のままで、新脈管形成もなく、ポケットまたは切断部(ナイフカット)の変化もなかった。2個の個(9%)では結合組織のパンヌスが

表 1

アンギオゲニン移植及び取捨する経過時間

経過時間 (週)	ラビット数	ポジティブの結果数
3	8	3 (27%)
6	14	5 (35%)
8	23	12 (52%)
9	16	13 (81%)
12	8	4 (50%)
26	6	2 (33%)

ヘマトキシリン及びエオシンで染色した組織切片は、周囲から半月脈管芽細胞組織により取囲まれた広い脈管を示した。隆起管を有する前膜組織は半月の表面に付着していた。加えて、新たな軟骨組織であると思われるものによる異常な組織欠陥は侵入組織と正常組織軟骨との界面において、観察された。

エチレン：ビニルアセートコポリマー(60:40)をラビットアルブミンと共にアンギオゲニン用キャリアーとして用いて同じ結果を得た。

# エルバックス (Elvax) 球のラビットアルブミン含 量の最適化

加入したアンギオゲニンを放出するコポリマー対アルブミンの最適な比を求めるために、ラビットアルブミン及びコポリマー（エルバックス 40 P）を種々の量で加入した一連のペレットを作った。ラビット血清アルブミン 50 ㎎及び所望の量の（<sup>125</sup>I）標識したアンギオゲニンを水 1 ㎖中に溶解し及び 0.22 ミクロンフィルターを通して濾過して紙筒チューブに入れて滅菌した。滅菌溶液を次いで凍結し及び凍結乾燥した。ラビットアルブミンはパルクキャリアー及びアンギオゲニン放出のエフェクターとして働き、ラビット由来であるのでラビットに移植した後に何ら免疫反応を何ら生じない。凍結乾燥したアルブミン-アンギオゲニン固体を滅菌した状態で混合して均質な粉末とした。粒径の均一性は製剤の有効性にとって重要である。次いで、コポリマーをジクロロメタンに溶解した 10% 溶液 1 ㎖（コポリマー 100 ㎎）を、所望の量の粉末を収容するチューブに加え、

0 及び 10 重量%を含有するペレットは 1 日にアンギオゲニンを少ない量で放出し、その後放出しなかつた。おそらく、放出された物質はペレットの表面上にあつたものと思われる。アルブミン

4.0 及び 5.0 重量%を含有するペレットは 1 日にアンギオゲニンを大きい量で放出し（それぞれ 5.8% 及び 7.7%）、アルブミン 3.0% のペレットは中位の放出速度を示したにすぎない。このデータから、コポリマー 2 重量部及びラビットアルブミン 1 重量部から成る実用的組成物を用いて 1 ペレット当たりアンギオゲニン 10 ナノグラム〜10 マイクログラムを含有するペレットを作った。

かかるペレットの有効性は、半月ポケットにおけるインプラントとしてメタルセルロースペレットの代りにコポリマー：アルブミン 2：1 のペレットから切断したピラミッド形状の片を用いて本質的に上述した外科的手法に従って試験した。アンギオゲニン全 100 ng を含有する 1 個は 2 個の片を鉗子を用いて各々のポケットの中に入れた。対照はアンギオゲニンを含有しなかつた。代

チューブをシールし、内容物を滅菌ミキサー上で高速攪拌において 10 分までの間攪拌して均一な懸濁液とした。この懸濁液を、18 ゲージスチール針を付けた 5 ㎖の使い捨て注射器の中に引き上げた。次いで、懸濁液を、無水（absolute）エタノール 20 ㎖をドライアイス/エタノール浴中で -78℃ に冷却した 50 ㎖ビーカーに移すことによる針筒の中に押出した。滴は冷エタノールと接触した際にゲル化して球形状となつてビーカーの底に沈んだ。10 分後にビーカーを浴浴から取り出し及び暖めさせて室温にした。ジクロロメタンをゆつくりエタノールに抜き取るにつれてビーズは白色に変つた。新しいエタノール溶液中で一晚インキュベートした後にペレットを濾液ブード中で風乾した。このようにして作つたペレット（数およそ 50）は寸法約 1 mm<sup>2</sup> であつた。これらのペレットからのアンギオゲニンの放出速度は、ペレットを 37℃ の生理的食塩水中にインキュベートすることによつて測定し及び（<sup>125</sup>I）アンギオゲニンの時間による放出を測定した。アルブミン

換的には、P-5 針に単一の 4/0 ビクリル或は 6/0 プロリン縫合糸をつけて用いてポケットを閉じた。動物を 8 週で屠殺し及び半月の治癒及び新血管形成を検査した。

結果を下記の表 2 に示す：

表 2		ポジティブ 効果を示す パーセンタ ー	
ラビットの数			
	治療した	新血管形成	効果無し
アンジオゲニン	21	21	45
対 照	2	0	10

アルブミンと他のポリマーとのブレンド或は混合物もまた時間放出インプラントにおけるアンギオゲニン用キャリアーとして用いてよい。各々の場合において最適な有効性についての割合は簡単な試験によつて求めることができる。

代理人の氏名 倉 内 恭 弘

同 風 間 弘 志